

ANÁLISIS DE LAS INTERACCIONES EN MEZCLAS BINARIAS DE CERAS SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS MICROESTRUCTURALES Y TEXTURA DE OLEOGELES

Pino, Neuvis Alejandro ⁽¹⁾, Marchetti, Lucas ⁽¹⁾, Lorenzo, Gabriel ^(1,2)

⁽¹⁾ Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA, CONICET La Plata-CICPBA-UNLP), 47 y 116, La Plata (1900). Argentina.

⁽²⁾ Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería, UNLP.

E-mail: pinoneuvisa@gmail.com

Introducción:

Las grasas sólidas son ampliamente usadas en formulaciones alimentarias aportando características texturales particulares a los alimentos. Sin embargo, conforme a la mejora continua de la conciencia de los consumidores en el ámbito de la salud, se ha impulsado la búsqueda de sustitutos de estas grasas que puedan reducir su consumo manteniendo las características sensoriales del producto final. La “estructuración” de aceites insaturados (oleogeles) ha surgido como un nuevo campo de investigación en este sentido. Los oleogeles (OGs) comprenden una fase orgánica que se estructura a través de agentes gelificantes que forman una red tridimensional para el atrapar el aceite. Son termorreversibles y se comportan de manera similar a las grasas sólidas, incluso cuando tienen un alto contenido de ácidos grasos insaturados (Blake et al., 2014). Las ceras se definen generalmente como un material químicamente heterogéneo que contiene ésteres de cadena larga derivados de ácidos grasos y alcoholes grasos, que muestran tendencias hidrófobas, tienen altas temperaturas de fusión y son sólidas a temperatura ambiente (Blake et al., 2018). Estas, en su mayoría, se obtienen como subproductos de otros procesos, lo que las hace comercialmente disponibles y económicamente viables. Son empleadas mayormente en la elaboración de productos cosméticos y farmacéuticos, sin embargo, se demostró recientemente que son capaces de estructurar aceites vegetales. Si bien existen algunos trabajos que analizan el efecto gelante de las ceras de forma individual, resulta muy escasa la bibliografía que aborde las posibles interacciones de estos componentes. Por lo tanto, el objetivo del trabajo fue analizar la interacción en mezclas binarias de ceras y su influencia sobre las características de OGs.

Parte experimental

Materiales:

Se utilizó aceite de girasol comercial (Molino Cañuelas, Buenos Aires, Argentina). Se emplearon ceras de soja (S), de abeja (A) y de carnauba (C), con puntos de fusión 43 °C, 62 °C y 82.4 °C respectivamente (Parvati, Bs. As., Argentina).

Preparación de muestras:

Los oleogeles fueron preparados por duplicado usando mezclas binarias de las ceras en una concentración total de 9 g/100 g, según se observa en la Tabla 1. Una vez pesadas las cantidades correspondientes de cera y aceite, se sometieron a calentamiento en baño termostático a 90°C ± 1°C por 30 min con agitación constante a 120 rpm. Posterior a la preparación de muestras, se dejaron reposar a temperatura ambiente por 30 min y luego se almacenó bajo refrigeración por 24 h (4°C aprox).

Tabla 1. Composición de las muestras, parámetros de color y dimensión fractal.

Muestra	Carnauba (g/100g)	Abeja (g/100g)	Soja (g/100g)	L*	a*	b*	Db
SSS	0	0	9	39.61 ^{BC}	-2.10 ^H	-2.19 ^A	1.80 ^C
SSC	3	0	6	40.94 ^D	-3.59 ^B	11.16 ^F	1.82 ^C
SCC	6	0	3	38.38 ^A	-3.33 ^C	12.62 ^G	1.68 ^B
CCC	9	0	0	40.38 ^{CD}	-2.76 ^D	14.99 ^I	1.83 ^C
ACC	6	3	0	48.49 ^G	-3.62 ^B	14.30 ^H	1.83 ^C
AAC	3	6	0	42.73 ^E	-4.38 ^A	7.09 ^E	1.46 ^A
AAA	0	9	0	46.69 ^F	-2.46 ^E	2.84 ^D	1.81 ^C
AAS	0	6	3	42.36 ^E	-2.29 ^F	0.52 ^C	1.78 ^C
ASS	0	3	6	38.18 ^A	-2.19 ^{FG}	-1.04 ^B	1.78 ^C

* Diferentes superíndices dentro de la misma fila indican que los valores promedio difieren significativamente ($P < 0.05$) según el test de Tukey.

Análisis de textura:

Para los análisis de textura se usó del texturómetro CT3 Texture Analyzer (Brookfield Engineering Laboratories Inc., Middleboro, EE.UU.). Cada muestra se sometió a una retro extrusión con el uso de una sonda cilíndrica de 25.4 mm de diámetro, la cual, penetraba la muestra 4 mm a 0.50 mm/s. A partir de los análisis se determinaron la Firmeza (N), Consistencia (mJ), Cohesividad (N) e Índice de viscosidad (mJ). Por otro lado, se realizaron ensayos de punción con una sonda de 6 mm de diámetro, penetrando la muestra un total de 20 mm a 0.50 mm/s, obteniéndose la Fuerza máxima de punción (N). Este último ensayo se realizó nuevamente después de someter las muestras a un nuevo ciclo térmico (fusión/enfriamiento) con el fin de evaluar su reversibilidad.

Color:

Se determinó el color de las muestras con el uso del equipo Chroma Meter CR-400 (Minolta Co., Nueva Jersey, EE.UU.), basado en el sistema de color CIELAB. Se testeó a lo largo de la superficie de la muestra un total de 8 veces.

Microscopía:

Para observar la cristalización de las muestras se usó un microscopio óptico con luz polarizada y cámara integrada Leica DM 500 (Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, Germany). Se recorrió todo el campo visual y se fotografiaron las muestras a un aumento de X10, X20 y X63. Posteriormente las imágenes fueron analizadas con el uso del programa ImageJ versión 1.53 (Wayne Rasband, EE.UU.), donde se determinó la dimensión fractal (D_B) con el uso del programa a través de la metodología “box counting”, mediante la siguiente ecuación:

$$D_b = \text{Pendiente de } \ln N / \ln \varepsilon \quad (\text{Ec. 1})$$

Siendo N el recuento de casillas que tienen píxeles en primer plano y ε el tamaño de las cajas (calibre).

FTIR:

Las mediciones de las muestras de oleogel, aceite y ceras se realizaron a temperatura ambiente utilizando un espectrómetro Thermo Nicolet iS10 (Thermo Scientific, MA, EE.UU.). Los espectros se adquirieron con el software OMNIC versión 9.2 (Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, EE.UU.). Se colocó la muestra directamente sobre la superficie del cristal

ATR y se escanearon los espectros entre 4000-400 cm^{-1} mediante la coadaptación de 32 barridos con una resolución de 4 cm^{-1} . Se realizaron nueve mediciones de cada muestra.

Rayos X:

Las muestras se midieron en un difractómetro Panalytical X'Pert a 45 Kv y 45 mA. Los difractogramas se obtuvieron en el rango angular 3-35° (2 θ) con un paso de 0.05° y un tiempo por paso de 1.35 s, lo que equivale a una velocidad de 0.035°/s. La radiación CuK α (1.542 Å) fue monocromatizada con monocromador de grafito. El difractómetro se encuentra equipado con una rendija de divergencia de 1° y una rendija de dispersión de 0.5°. Se determinó el área total y el área de los picos, para luego calcular la cristalinidad teórica según la Ec. 2.

$$\% \text{ Cristalinidad} = \frac{\sum \text{área de picos}}{\text{área total}} \quad (\text{Ec. 2})$$

Modelo estadístico:

El análisis estadístico de los resultados obtenidos se realizó mediante el análisis de la varianza (ANOVA). Para determinar las diferencias significativas entre las muestras se utilizó el Test de Tukey a un nivel de significancia del 95%. Se utilizó el programa InfoStat 2020 (UNC, Córdoba, Argentina).

Resultados y discusión:

Textura y apariencia:

Los productos exhibieron un rango de firmeza muy amplio (0.16 N - 88.7 N), identificando que la interacción entre las ceras fue el factor controlante en la textura de los geles. Las mezclas A/C mostraron un marcado efecto sinérgico, resultando en valores de firmeza mayores que los de los OGs de las ceras puras, principalmente en la combinación AAC como puede verse en la Fig. 1. Esto podría explicarse por la diferencia entre la composición de las ceras, ya que la de carnauba tiene mayor contenido de ésteres de ácidos grasos y mayor punto de fusión, mientras que la de abeja presenta un mayor contenido de alifáticos (Blake et al., 2018). Estas diferencias en la composición están asociadas a distintos mecanismos de cristalización lo que podría explicar el efecto sinérgico observado. En cuanto al agregado de S, mostró efectos antagónicos con las otras ceras (interacción negativa), debilitando su estructura y llegando obtenerse sistemas líquidos viscosos como resultaron SSS o SSC. La recrystalización de los OGs no ocasionó un cambio significativo en las propiedades mecánicas (fuerza de punción), resultando en matrices térmicamente estables y/o reversibles.

Respecto al color, como se observa en la Tabla 1, b^* aumentó marcadamente (amarillo más intenso) con respecto a la concentración de C y levemente con el agregado de A en la formulación, atribuible al color propio de cada cera. En el caso del parámetro cromático a^* las diferencias significativas observadas no pudieron ser asociadas a la composición de los OGs. A su vez el rango de valores -2.10 a -4.38 (ligera tendencia al verde) resulta muy pequeño por lo que no podría ser distinguido a simple vista. La luminosidad aumentó significativamente con la concentración de A, la cual al ser combinada con C llegó a $L^*=48.49$ en OG de ACC.

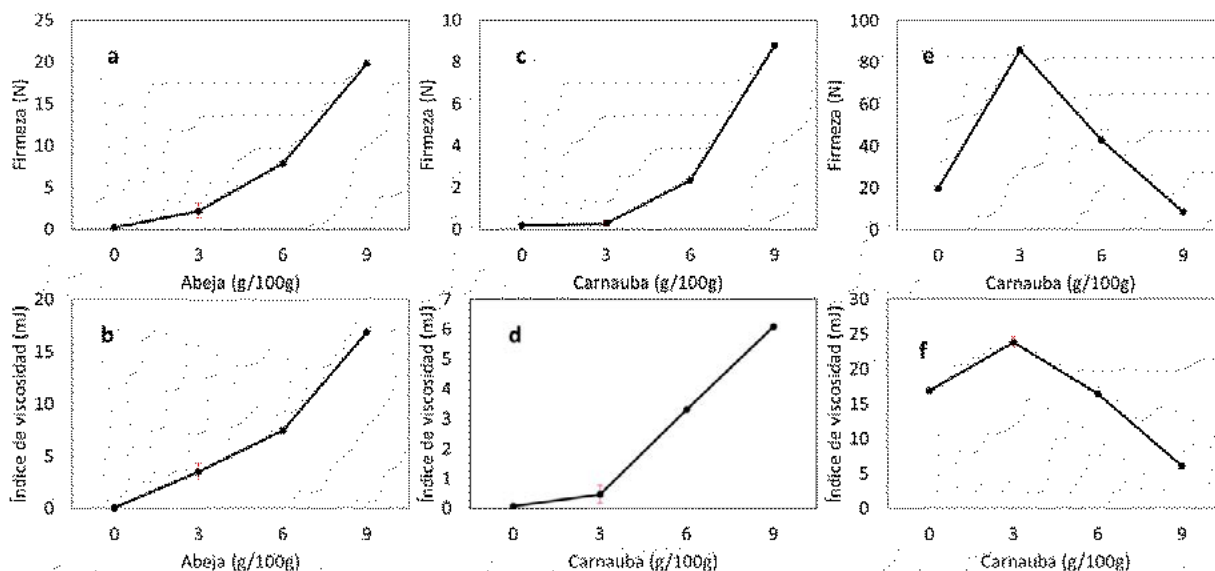


Fig. 1. Firmeza e índice de viscosidad en OGs a partir de mezclas binarias A-S (a y b), C-S (c y d) y A-C (e y f).

Microestructura:

Si bien las formulaciones con 9 g/100g de S no formaron una estructura gelificada, se observó la presencia de pequeños cristales dispersos (Fig. 2). Los OGs de A presentaron cristales de forma acicular o aguja mientras que en los de C los cristales se dispusieron como agregados de varas cortas homogéneamente distribuidos (Moghtadaei et al., 2018, Tabibiazar et al., 2020).

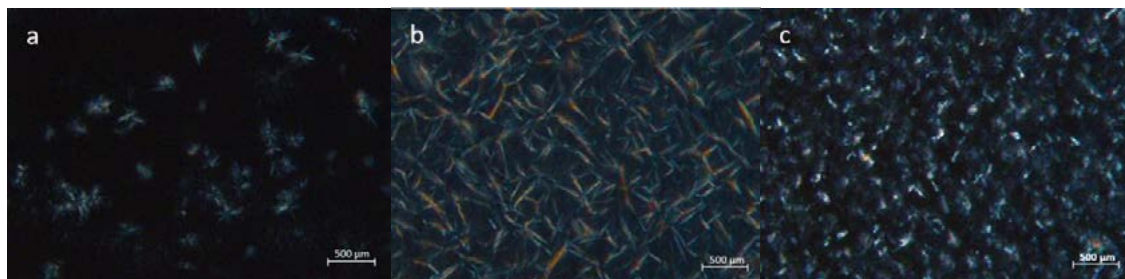


Fig. 2. Cristales de OGs Soja 9g/100g (a), Abeja 9g/100g (b) y Carnauba 9g/100g (c) con aumento x63.

La presencia de estos dos hábitos cristalinos en las mezclas A/C resultaría en un ordenamiento compacto que podría explicar la mayor firmeza de estos oleogeles. Asimismo, la combinación AAC arrojó valores de dimensión fractal marcadamente menores que el resto de las formulaciones (Tabla 1). Blake et al. (2014) asociaron las estructuras más homogéneas en oleogeles a valores más altos de Db, por lo que la mayor heterogeneidad de la muestra AAC podría deberse a la presencia de los dos sistemas cristalinos mencionados previamente. La Fig. 3 muestra el espectro FTIR obtenido para el aceite de girasol empleado. El mismo presentó un patrón característico donde se destacan los picos en la región $\sim 3008 \text{ cm}^{-1}$, correspondiente al estiramiento del enlace C=CH debido a la presencia de insaturaciones del ácido graso, también los picos entre $2960 - 2850 \text{ cm}^{-1}$ debido a estiramientos asimétricos y simétricos de $-\text{CH}_3$ y $-\text{CH}_2$. Se observa otro pico en $\sim 1743 \text{ cm}^{-1}$ que representa el estiramiento del grupo carbonilo C=O y en la región $\sim 1457 \text{ cm}^{-1}$ se presenta la deformación asimétrica en el plano (flexión) de CH_3 . Los picos entre $1240 - 1090 \text{ cm}^{-1}$ corresponden al estiramiento del

enlace C-O. Y por último se observa un pico en $\sim 722\text{ cm}^{-1}$ el cual representa varias vibraciones (de giro y fuera del plano) de $-\text{CH}_2$ (Vongsvivut et al., 2013; Cortez, 2020).

Los espectros de los OGs mostraron las mismas bandas que el aceite. Sin embargo, la mezcla AAC presentó diferencias significativas en las regiones $\sim 2920\text{ cm}^{-1}$, $\sim 2852\text{ cm}^{-1}$, $\sim 1457\text{ cm}^{-1}$, $\sim 1160\text{ cm}^{-1}$ y $\sim 720\text{ cm}^{-1}$, donde se observó un desplazamiento significativo ($P < 0.05$) hacia menores valores de frecuencia (Fig. 3). Gómez-Estaca et al. (2019) asociaron este tipo de corrimiento a un mayor ordenamiento, probablemente debido a un empaquetamiento más cerrado de las cadenas carbonadas de los lípidos.

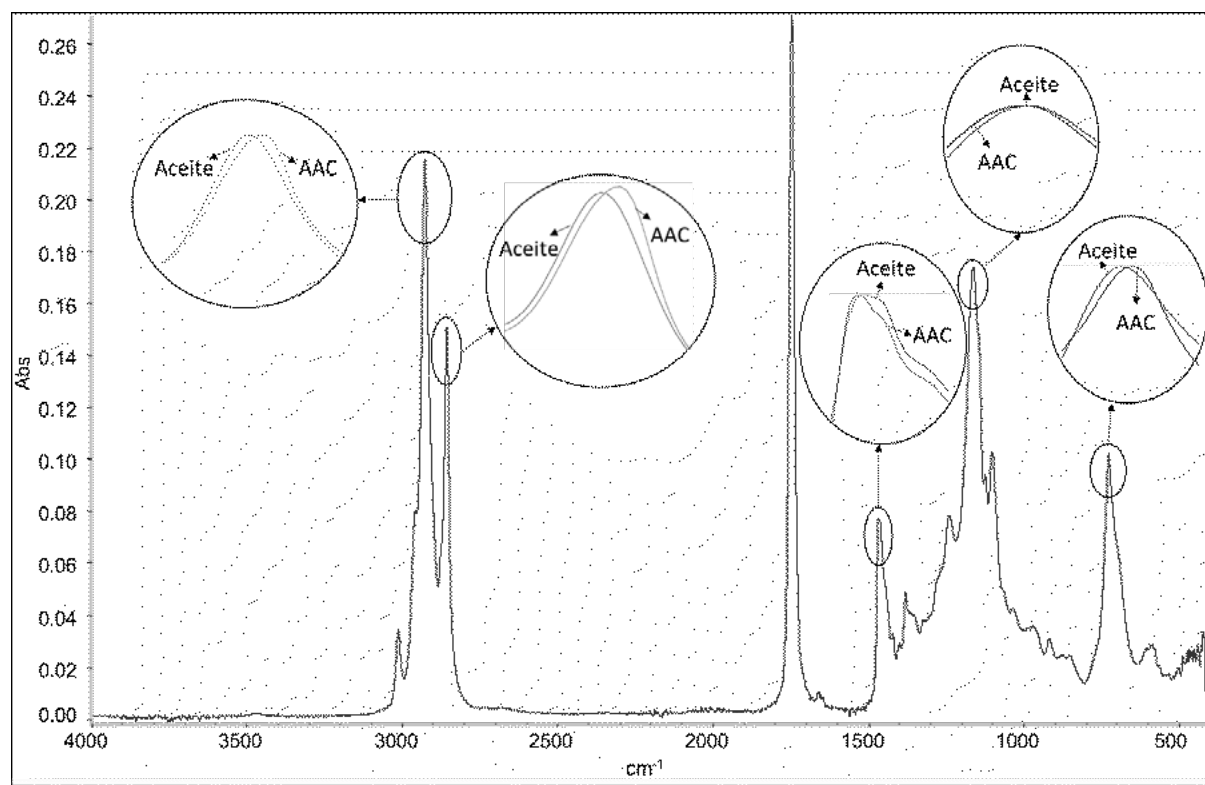


Fig. 3. Espectro FTIR del aceite de girasol y comparación de picos con muestra AAC

En la Fig. 4a se muestra el patrón de difracción de rayos X de las ceras de abeja y carnauba, donde se observaron dos picos de gran intensidad a 21.4° y 23.8° correspondientes a una distancia interplanar de 0.370 nm y 0.412 nm , respectivamente (siendo mayor la intensidad en la cera de abeja). Estos picos están relacionados con un empaquetamiento de subceldas ortorrómbicas según Trujillo-Ramírez et al. (2022).

Esta estructura cristalina fue heredada por todos los OGs, los cuales presentaron picos en esta misma zona (Fig. 4b), a excepción del OG compuesto únicamente por cera de soja. La mezcla con $6\text{ g}/100\text{ g A}$ y $3\text{ g}/100\text{ g C}$ (AAC) fue la que presentó una mayor cristalinidad (4.52%) que el resto de los OGs.

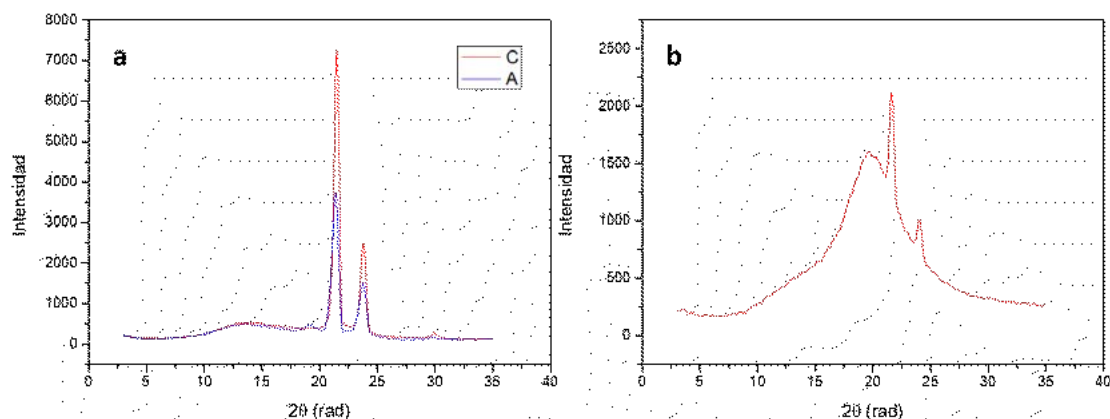


Fig 4. Difracción de rayos x de cera de carnauba y abeja (a) y muestra AAC (b).

Conclusiones:

Se observó una región de interacciones positivas entre las ceras de A y C, registrándose un máximo valor de las propiedades mecánicas y con un correlato en las características microestructurales. Esto podría explicarse por una complementariedad de los dos tipos de estructura cristalina predominantes en cada cera.

Las mezclas de ceras permitieron conseguir OGs con propiedades mecánicas similares a grasas comerciales y abarcar un amplio espectro de propiedades reológicas, lo que le confiere una gran versatilidad para incorporarlo como alternativa de grasas saturadas en distintos sistemas alimentarios.

A su vez la existencia de la región de interacciones positivas posibilitaría el empleo de menores niveles de ceras para obtener una misma textura, resultando en un proceso más eficiente. En una futura etapa se propone estudiar con mayor profundidad los efectos térmicos y de concentración de los OGs de A+C.

Bibliografía:

- Blake, A.I., Co, E.D., Marangoni, A.G., (2014). Structure and physical properties of plant wax crystal networks and their relationship to oil binding capacity. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 91(6), 885-903.
- Blake, A.I., Toro-Vazquez, J.F., Hwang, H.-S., (2018). *Wax oleogels, Edible oleogels*. Elsevier, pp. 133-171.
- Cortez, P.M.M., (2020). La espectroscopia FTIR-ATR aplicada al análisis de alimentos y bebidas, in: *CIATEJ* (Ed.), pp. 83-116.
- Gómez-Estaca, J., Herrero, A.M., Herranz, B., Álvarez, M.D., Jiménez-Colmenero, F., Cofrades, S., (2019). Characterization of ethyl cellulose and beeswax oleogels and their suitability as fat replacers in healthier lipid pâtés development. *Food Hydrocolloids* 87, 960-969.
- Moghtadaei, M., Soltanizadeh, N., Goli, S.A.H., (2018). Production of sesame oil oleogels based on beeswax and application as partial substitutes of animal fat in beef burger. *Food Research International* 108, 368-377.
- Tabibiazar, M., Roufegarinejad, L., Hamishehkar, H., Alizadeh, A., (2020). Preparation and characterization of carnauba wax/adipic acid oleogel: A new reinforced oleogel for application in cake and beef burger. *Food Chemistry* 333, 127446.
- Trujillo-Ramírez, D., Reyes, I., Lobato-Calleros, C., Vernon-Carter, E., Alvarez-Ramirez, J., (2022). Chia seed oil-candelilla wax oleogels structural features and viscoelasticity are enhanced by annealing. *LWT* 153, 112433.
- Vongsvivut, J., Heraud, P., Gupta, A., Puri, M., McNaughton, D., Barrow, C.J., (2013). FTIR microspectroscopy for rapid screening and monitoring of polyunsaturated fatty acid production in commercially valuable marine yeasts and protists. *Analyst* 138(20), 6016-6031.